



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA“ DIN BUCUREȘTI**



Str. Dionisie Lupu 37, sector 2, București, 020021, România, www.umfd.ro, email: rectorat@umfd.ro

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” DIN BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

*Produșii amiloidogeni ai microbiotei intestinale,
permeabilitatea barierei intestinale și inflamația
gastrointestinală în boala Parkinson sporadică*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. BOGDAN OVIDIU POPESCU**

**Student-doctorand:
DUMITRESCU LAURA**

2023

Cuprinsul tezei de doctorat

Lista lucrărilor științifice publicate	6
Lista cu abrevieri	7
Introducere	9
I. Stadiul actual al cunoașterii	12
1. Boala Parkinson sporadică	13
1.1. Considerente generale	13
1.2. Viziuni actuale asupra etiopatogenezei	21
1.2.1. Stadializarea Braak, ipoteza Braak și teoria dublei lovituri	21
1.2.2. Modelul originii alfa-sinucleinei și conectomului: subtipurile cu debut cerebral și cu debut periferic (enteral)	23
1.2.3. Disbioza intestinală, disfuncția barierei intestinale și inflamația gastrointestinală	24
1.2.4. Dovezi pentru propagarea de tip prionic a alfa-sinucleinei prin axa intestin-creier	28
2. Producții amiloidogeni ai microbiotei intestinale și însămânțarea încrucișată a alfa-sinucleinei.....	31
2.1. Microbiomul intestinal amiloidogen: către o nouă ipoteză etiopatogenică în boala Parkinson cu debut enteral	31
2.2. Endotoxina bacteriana (lipopolizaharidul)	33
2.3. Curli și alte proteine amiloid funcționale bacteriene	34
2.4. Ramnolipidul și alți biosurfactanți bacterieni	36
2.5. Alți produși amiloidogeni ai microbiotei intestinale	37
II. Contribuții personale	38
3. Conceptul și metodologia cercetării	39
3.1. Justificarea cercetării	39
3.2. Obiective, ipoteze de lucru și întrebări de cercetare	47
3.3. Designul studiilor	50
3.4. Organizarea studiilor, recrutarea și înrolarea	51
3.5. Evaluarea clinică și colectarea datelor	53
3.6. Colectarea, stocarea și procesarea probelor biologice	55
3.7. Metode de laborator	55

3.7.1. Markeri de expunere la endotoxina bacteriană: nivelul seric al lipopolizaharidului și al proteinei care leagă lipopolizaharidul	55
3.7.2. Markeri de permeabilitate a barierei intestinale: zonulina serică și fecală	56
3.7.3. Markeri de inflamație gastrointestinală: calprotectina serică și fecală	57
3.8. Analiza statistică	57
3.9. Etică și protecția datelor cu caracter personal	58
3.10. Finanțare	59
4. Primul studiu: Corelații între markerii de inflamație periferică testați de rutină în practica clinică și markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală la pacienții cu boală Parkinson sporadică	60
4.1. Caracteristicile populației de studiu	60
4.2. Analiză transversală preliminară	64
4.3. Corelații	66
4.4. Discuții	71
5. Al doilea studiu: Markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală la pacienții cu boală Parkinson sporadică comparativ cu martori fără boală Parkinson.....	76
5.1. Caracteristicile populației de studiu	76
5.2. Lipopolizaharidul seric și lipoproteina care leagă lipopolizaharidul	78
5.3. Zonulina serică și fecală	91
5.4. Calprotectina serică și fecală	98
5.5. Discuții	105
6. Al treilea studiu: Markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală la pacienții cu boală Parkinson sporadică comparativ cu martori cu boală Parkinson familială cu debut precoce ..	115
6.1. Caracteristicile populației de studiu	115
6.2. Lipopolizaharidul seric și lipoproteina care leagă lipopolizaharidul	119
6.3. Zonulina serică și fecală	121
6.4. Calprotectina serică și fecală	124
6.5. Discuții	126

7. Concluzii și contribuții personale	130
7.1. Concluzii	130
7.2. Sumarul contribuțiilor personale	132
Dedicații și mulțumiri	134
Bibliografie	136
Anexa 1 – Seturile de date anonimizate	186
Anexa 2 – Materiale suplimentare: analiză statistică	190

Lista lucrărilor științifice publicate

Lucrări ISI in extenso pe care le-am publicat din tema tezei de doctorat (autor principal):

1. Dumitrescu L, Popescu-Olaru I, Cozma L, Tulbă D, Hinescu ME, Ceafalan LC, Gherghiceanu M, Popescu BO. Oxidative Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, 2018:2406594, doi:10.1155/2018/240659, <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/2406594/>, IF 4.86 (2018). Parte din Capitolul 1, Subcapitolul 1.2, paginile 24 - 28.

2. Manole E[#], Dumitrescu L[#], Niculițe C, Popescu BO, Ceafalan LC. Potential Roles of Functional Bacterial Amyloid Proteins, Bacterial Biosurfactants and Other Putative Gut Microbiota Products in the Etiopathogeny of Parkinson's Disease. *Biocell* 2021, 45(1): 1-16, doi:10.32604/biocell.2021.013452, <https://www.techscience.com/biocell/v45n1/41395>, IF 1.1 (2021). Parte din Capitolul 2, paginile 31 -37.

3. Dumitrescu L, Marta D, Dănaș A, Lefter A, Tulbă D, Cozma L, Manole E, Gherghiceanu M, Ceafalan LC, Popescu BO. Serum and Fecal Markers of Intestinal Inflammation and Intestinal Barrier Permeability are Elevated in Parkinson's Disease, *Frontiers in Neuroscience* 2021, 15, 689723, doi:10.3389/fnins.2021.689723, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.689723/full>, IF 5.15 (2021). Parte din Capitolul 5, paginile 75 – 113.

Rezumatul tezei de doctorat

Introducere

Teza prezintă cele trei studii pe care le-am desfășurat ca parte a cercetării mele doctorale, sub conducerea Prof. Dr. Bogdan Ovidiu Popescu. Scopul general al cercetării a fost să contribuie la o mai bună caracterizare a relațiilor dintre markerii serici de expunere la endotoxina bacteriană (i.e., lipopolizaharidul (LPS) și proteina care leagă LPS (LBP)), markerii de permeabilitate a barierei intestinale (i.e., zonulina serică și fecală) și markerii de inflamație gastrointestinală (i.e., calprotectina serică și fecală) la persoane cu boală Parkinson (BP) sporadică probabil multifactorială. În primul studiu am evaluat corelațiile dintre markerii sus-menționați și markerii de inflamație periferică evaluați de rutină în practica clinică curentă la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială. În al doilea studiu am evaluat nivelurile markerilor sus-menționați la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori fără BP. În al treilea studiu am evaluat aceiași markeri la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu pacienți cu BP familială cu debut precoce (i.e., probabil monogenică). Tema de cercetare este importantă, expunerea la endotoxină bacteriană, alterarea barierei intestinale și inflamația gastrointestinală fiind potențiali factori de risc modificabili pentru apariția și progresia BP multifactoriale (posibil contribuind și la BP monogenică). Totodată, acești markeri s-ar putea dovedi folositori pentru diagnosticul BP prodromale.

Studiile au inclus în total 61 de participanți, dintre care 28 de pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială (toate studiile), 28 de martori fără BP (al doilea studiu) și 5 martori cu BP familială cu debut precoce (al treilea studiu). În primul studiu am găsit că beta2-microglobulina serică și raportul monocite-limfocite (MLR) se corelează semnificativ cu calprotectina serică. În al doilea studiu am găsit niveluri semnificativ mai mici ale LBP la pacienții cu BP probabil multifactorială comparativ cu martorii fără BP și niveluri semnificativ crescute ale zonulinei și calprotectinei serice și fecale. În al treilea studiu am găsit nivelul crescute ale LPS seric și zonulinei fecale și niveluri scăzute ale LBP la pacienții cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu cei cu BP familială cu debut precoce. Literatura în domeniu s-a îmbogățit rapid pe parcursul ultimilor ani, însă niciunul dintre studiile disponibile nu a testat concomitent toți acești markeri și nici corelațiile dintre aceștia și markerii de inflamație periferică testați de rutină în practica clinică.

Rezultatele studiilor mele sugerează că expunerea cronică la endotoxină bacteriană, permeabilitatea intestinală crescută și inflamația gastrointestinală se întâlnesc în BP sporadică multifactorială și ar putea juca un rol în etiopatogenia ei.

I. Nivelul actual al cunoașterii

1. Boala Parkinson sporadică

BP este o alfa-sinucleinopatie multisistemică progresivă incurabilă. La nivel mondial afectează peste 8.5 milioane de persoane (WHO, 2023). Cele mai multe cazuri sunt sporadice multifactoriale, unul sau mai mulți factori de mediu, precum și predispoziția poligenică, contribuind la etiopatogenie. BP monogenice sunt rare, tipic familiale și cu debut clinic precoce. Stilul de viață și alți factori potențial modificabili reprezintă aspecte de interes, putând oferi premisele unor intervenții profilactice sau modificatoare de evoluție a bolii (Ascherio and Schwarzschild, 2016).

Din punct de vedere neuropatologic, BP este caracterizată prin prezența neurodegenerării selective cu acumulare intraneuronală a unor agregate insolubile, compuse în principal din alfa-sinucleină modificată conformațional, numite corpi Lewy și neurite Lewy (Mezey et al., 1998). Patologia Lewy este întâlnită în 95-99% dintre cazurile de BP, inclusiv în majoritatea formelor monogenice (Balestrino and Schapira, 2020; Berg et al., 2014; Braak et al., 2003a; Coughlin et al., 2019). Modificările neuroinflamatorii și disfuncția neuronală sunt de asemenea întâlnite, implicând în evoluție atât sistemul nervos periferic cât și pe cel central (Balestrino and Schapira, 2020; Braak et al., 2003a; Coughlin et al., 2019).

În majoritatea cazurilor, modificările anatomopatologice debutează intestinal, la nivelul sistemului nervos enteric, răspândindu-se ulterior, la nivelul sistemului nervos central, prin axa neurală intestin-creier, probabil printr-un mecanism prionic. Această viziune asupra etiopatogeniei BP înglobează teoria dublei lovituri a lui Braak (cel puțin „lovitura” de la nivel intestinal) (Braak and Del Tredici, 2017; Hawkes et al., 2007; Hawkes et al., 2009) și corespunde modelului sediului de origine a alfa-sinucleinei și conectomului, propus recent de Per Borghammer, care afirmă existența unui subtip de BP cu debut periferic, enteral, și a unui subtip cu debut cerebral (Borghammer, 2021; Borghammer and Van Den Berge, 2019; Horsager et al., 2020; Horsager et al., 2022). Evenimentele care declanșează transformarea amiloidă a alfa-sinucleinei și mecanismele care leagă acest fenomen de neurodegenerarea selectivă observată în BP necesită clarificare suplimentară. Latența lungă de la debutul biologic al BP și până la prezentarea clinică oferă o fereastră terapeutică largă pentru intervenții care ar putea încetini sau opri progresia BP.

Persoanele cu BP au o prevalență crescută a disbiozei intestinale, aceasta fiind prezentă chiar și în stadiile de debut ale bolii (Baldini et al., 2020; Bedarf et al., 2017; Cirstea et al., 2020; Dumitrescu et al., 2018; Heintz-Buschart et al., 2018; Hill-Burns et al., 2017; Houser

et al., 2018; Houser and Tansey, 2017; Nishiwaki et al., 2020; Nuzum et al., 2020). In mod interesant, studii experimentale arată că microbiota intestinală este necesară pentru apariția patologiei Lewy și a dizabilității motorii la șoareci care hiperexprimă alfa-sinucleină (Sampson et al., 2016). Intre posibilele consecințe ale disbiozei intestinale, excesul de produși amiloidogeni bacterieni ridică un interes aparte, aceștia fiind potențial factori declanșatori ai modificărilor conformaționale ale alfa-sinucleinei la persoanele cu BP multifactorială cu debut enteral.

2. Producții amiloidogeni ai microbiotei intestinale și însămânțarea încrucișată a alfa-sinucleinei

Tractul gastrointestinal are o suprafață mare la nivelul căreia alfa-sinucleina ar putea intra în contact cu factori de mediu, în special în prezența hiperpermeabilității barierei intestinale (care ar permite un contact mai apropiat între xenobiotice potențial amiloidogene din lumenul gastrointestinal și alfa-sinucleina din neuronii enterali) și inflamației gastrointestinale (care induce hiperexpresie a alfa-sinucleinei în neuronii enterali). Amiloidogeneza alfa-sinucleinei (i.e., modificarea conformațională cu împăturire defectuoasă, autoagregarea cu formare de agregate insolubile și însămânțare asupra proteinelor nemodificate) este aspectul patogenic central a BP multifactoriale. Inflamația gastrointestinală și creșterea permeabilității intestinale, legate fie de disbioza intestinală fie de alți factori, se întâlnesc în BP și sunt potențiali factori de risc pentru apariția acestuia, formând un mediu gastrointestinal care ar putea promova amiloidogeneza alfa-sinucleinei, și ar putea crește susceptibilitatea neuronală la neurodegenerare (Manole et al., 2021). Dovezi experimentale sugerează că prezența anumitor produși amiloidogeni ai microbiotei intestinale, cum ar fi entodoxina bacteriană LPS, proteina amiloid funcțională curli și biosurfactantul bacterian rhamnolipid, precum și prezența altor xenobiotice amiloidogene la nivelul lumenului intestinal (de exemplu din surse de mediu sau alimentare) ar putea declanșa sau accelera amiloidogeneza alfa-sinucleinei (Brown, 2019; Brown et al., 2023; Clunn et al., 2000; Lange et al., 2003; Lerner, 2022; Manole et al., 2021; Niehaus and Lange, 2003). Prin urmare prezența unei microbiote intestinale amiloidogene ar putea declanșa sau exacerba amiloidogeneza alfa-sinucleinei (în prezența permeabilității crescute a barierei intestinale și s inflamației gastrointestinale) fiind un potențial factor de risc modificabil în BP sporadică cu debut enteral.

II. Contribuții personale

3. Conceptul și metodologia cercetării

Majoritatea persoanelor cu BP au simptome gastrointestinale ca prime manifestări ale bolii, constipația precedând parkinsonismul chiar și cu o decadă (Postuma et al., 2015). La momentul actual se consideră că simptomatologia gastrointestinală este legată de modificările anatomopatologice care apar la nivelul sistemului nervos enteric înainte de a se propaga la nivelul sistemului nervos central prin nervul vag și conectomul simpatic (Borghammer, 2021; Braak et al., 2006; Devos et al., 2013).

Mai mulți markeri de inflamație periferică sunt testați în practica clinică de rutină, cei mai mulți dintre aceștia fiind ieftini și ușor accesibili. Aceștia includ viteza de sedimentare a hematiilor (VSH), fibrinogenul, proteina C reactiva (PCR), beta2-microglobulina serică, raportul neutrofile-limfocite (NLR), raportul monocite-limfocite (MLR) și raportul trombocite-limfocite (PLR).

Endotoxina produsă de bacteriile Gram negative, LPS, este utilizată pentru a induce modificări anatomopatologice de BP la modele animale (Deng et al., 2020; Dutta et al., 2008; Gao et al., 2011a; Kelly et al., 2014). Variantele de LPS produse de diferite specii bacteriene au capacități diferite de a induce neuroinflamație și toxicitate (Raetz and Whitfield, 2002; Vatanen et al., 2016). În absența infecțiilor bacteriene, sursa principală de LPS circulant la om sunt bacteriile Gram negative din microbiomul intestinal (Bhattacharyya and Bhunia, 2021; Shannon, 2022). Microbiomul intestinal al pacienților cu BP are niveluri crescute de bacterii Gram negative care produc LPS proinflamator, în timp ce microbiomul martorilor fără BP are niveluri mai crescute de bacterii Gram pozitive și de bacterii Gram negative care produc LPS anti-inflamator (Gorecki et al., 2019; Scheperjans et al., 2015; Scheperjans et al., 2016; Yan et al., 2021). Contaminarea alimentelor cu LPS poate de asemenea contribui la endotoxemie iar nivelurile de LPS cresc tranzitor după mese bogate în lipide (Erridge et al., 2007). Totodată, paradontoza se asociază cu risc crescut de BP și cu niveluri crescute ale LPS (Chen et al., 2018; Chen et al., 2017; Olsen et al., 2020). Creșterea permeabilității barierei intestinale, obezitatea și bolile de ficat sunt de asemenea asociate cu niveluri crescute de LPS circulant (Hersoug et al., 2016; Kitabatake et al., 2017). Mai multe metode de laborator pot fi folosite pentru măsurarea nivelului seric sau plasmatic de LPS, cea mai frecvent folosită fiind ELISA (Citronberg et al., 2016; Forsyth et al., 2011; Hasegawa et al., 2015; Loffredo et al., 2020; Pal et al., 2015; Wijeyekoon et al., 2020; Yao et al., 2016). Prezența LPS în sânge induce sinteza de LBP care are timp de înjumătățire mai lung și este considerat un marker mai bun pentru

aprecierea expunerii la endotoxină bacteriană (Schumann, 2011). Cu toate acestea, și nivelurile de LBP au reproductibilitate limitată (Citronberg et al., 2016). Mai mult, niveluri scăzute de LBP augmentează activarea sistemului imun indusă de LPS în timp ce niveluri crescute o scad (Gutsmann et al., 2001), ceea ce face interpretarea rezultatelor dificilă (Forsyth et al., 2011; Zhao et al., 2023).

Prezența permeabilității crescute a barierei intestinale a fost demonstrată la pacienții cu BP prin metode cu specificitate înaltă (Forsyth et al., 2011; Perez-Pardo et al., 2019). Zonulina este parte din joncțiunile strânse ale barierei intestinale, modulându-i permeabilitatea prin dezmembrarea zonulei occludens (Ajamian et al., 2019; Fasano, 2012; Ohlsson et al., 2017b). Eliberarea de zonulină este declanșată de bacterii dar și de diferite alimente, nivelul local al acesteia corelându-se cu permeabilitatea barierei intestinale (Fasano, 2012). Nivelul de zonulină poate fi măsurat prin ELISA. Nivelul său seric este considerat marker de permeabilitate a barierei intestinale (Aho et al., 2021; Boncuk Ulas et al., 2023; Loffredo et al., 2020; Mulak et al., 2019; Schwiertz et al., 2018). Relevanța zonulinei serice ca marker de barieră intestinală este încă dezbătută (Ajamian et al., 2019; Fasano, 2021; Massier et al., 2021; Ohlsson et al., 2017a; Talley et al., 2020).

Calprotectina este o proteină pleiotropică similară citokinelor, cu efect bacteriostatic și fungistatic (Walsham and Sherwood, 2016). Este eliberată la locul inflamației de neutrofile activate, monocite și celule endoteliale, nivelurile sale crescând rapid în prezența bacteriilor (Dhaliwal et al., 2015; Diamanti et al., 2010; Jensen et al., 2011; Kowalski and Mulak, 2019; Moein et al., 2017). Este foarte stabilă în produse biologice și poate fi măsurată prin ELISA. Nivelul fecal de calprotectină este un marker foarte bine caracterizat de inflamație intestinală, însă nivelurile crescute de calprotectină fecală nu sunt specifice bolilor inflamatorii intestinale, putând fi modificate și în alte circumstanțe (Khaki-Khatibi et al., 2020; Mumolo et al., 2018). Relevanța calprotectinei serice ca marker de inflamație intestinală nu e clară.

Obiectivele principale ale cercetării doctorale:

1. să evalueze markeri serici de expunere la endotoxină bacteriană (i.e., LPS și LBP în ser), markeri serici și fecali de permeabilitate a barierei intestinale (i.e., zonulină serică și fecală) și markeri serici și fecali de inflamație gastrointestinală (i.e., calprotectină serică și fecală) la persoane cu BP sporadică probabil multifactorială, comparativ cu martori fără BP și martori cu BP familială cu debut precoce (i.e., probabil monogenică).

2. să evalueze corelațiile dintre markerii de inflamație periferică care sunt testați de rutină în practica clinică și markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a

barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială.

Obiectivele secundare ale cercetării doctorale sunt:

1. să evalueze utilitatea markerilor serici de expunere la endotoxină bacteriană, markerilor serici și fecali de permeabilitate a barierei intestinale și markerilor serici și fecali de inflamație gastrointestinală în prezicerea riscului sau probabilității pentru diagnosticul de BP sporadică probabil multifactorială (versus a nu avea BP clinică).

2. să evalueze corelațiile dintre markerii serici de expunere la endotoxină bacteriană, markerii serici și fecali de permeabilitate a barierei intestinale și markerii serici și fecali de inflamație gastrointestinală și caracteristicile BP la persoane cu BP sporadică probabil multifactorială.

Intrebările cercetării sunt:

1. Există diferențe semnificative între nivelurile serice de LPS și LBP (i.e., markeri de expunere la endotoxină bacteriană) la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori fără BP și cu martori cu BP familială cu debut precoce?

2. Există diferențe semnificative între nivelurile serice și fecale ale zonulinei (i.e., markeri de permeabilitate a barierei intestinale) la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori fără BP și cu martori cu BP familială cu debut precoce?

3. Există diferențe semnificative între nivelurile serice și fecale de calprotectină (i.e., markeri de inflamație gastrointestinală) la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori fără BP și cu martori cu BP familială cu debut precoce?

4. Markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală prezic riscul sau probabilitatea pentru diagnosticul de BP sporadică probabil multifactorială (versus a nu avea BP clinică)?

5. Markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală se corelează cu caracteristici ale BP la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială?

6. Există corelații semnificative între markerii de inflamație periferică testați de rutină în practica clinică și markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială?

Ipotezele cercetării sunt:

1. Nivelurile medii ale LPS seric sunt mai mari la pacienții cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martorii fără BP și comparativ cu martorii cu BP familială cu debut precoce. Nivelurile serice de LPS nu prezic riscul / probabilitatea de a avea BP sporadică probabil multifactorială (comparativ cu a nu avea BP clinică) și nu se asociază cu durata, stadiul și severitatea BP.

2. Nivelurile medii ale LBP serice sunt mai scăzute la pacienții cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori fără BP și cu martori cu BP familială cu debut precoce. Nivelurile serice joase de LBP se asociază cu un risc crescut de a avea BP sporadică probabil multifactorială (comparativ cu a nu avea BP clinică) și cu durata, stadiul și severitatea BP.

3. Nivelurile medii ale zonulinei serice și fecale sunt mai crescute la pacienții cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori fără BP și cu martori cu BP familială cu debut precoce. Nivelurile serice și fecale crescute ale zonulinei se asociază cu un risc crescut de a avea BP sporadică probabil multifactorială (comparativ cu a nu avea BP clinică) și cu durata, stadiul și severitatea BP.

4. Nivelurile medii ale calprotectinei serice și fecale sunt mai crescute la pacienții cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori fără BP și cu martori cu BP familială cu debut precoce. Nivelurile serice și fecale crescute ale calprotectinei se asociază cu un risc crescut de a avea BP sporadică probabil multifactorială (comparativ cu a nu avea BP clinică) și cu durata, stadiul și severitatea BP.

5. Markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală utilizați în diferite combinații sunt predictorii mai buni decât atunci când sunt folosiți izolat pentru riscul de a avea BP sporadică probabil multifactorială (comparativ cu a nu avea BP).

6. Nu există corelații semnificative între markerii de inflamație periferică testați de rutină în practica clinică și markerii de expunere la endotoxină bacteriană (i.e., LPS și LBP în ser), markerii de permeabilitate a barierei intestinale (i.e., zonulina serică și fecală), markerii de inflamație gastrointestinală (i.e., calprotectina serică și fecală) la pacienții cu BP sporadică probabil multifactorială.

Designul studiilor

Primul studiu are un design transversal, cu analiză descriptivă și corelații. Include pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială care îndeplinesc criteriile de includere și nu au niciun criteriu de excludere dintre cele consemnate mai jos. Studiul evaluează prevalența

nivelurilor crescute ale markerilor de inflamație periferică testați de rutină în practica clinică (rezultate obținute din fișele medicale recente, în cazul în care au fost disponibile) la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială și corelațiile dintre nivelurile acestor markeri și nivelurile serice ale LPS și LBP, nivelurile serice și fecale ale zonulinei și nivelurile serice și fecale ale calprotectinei, precum și dintre nivelurile tuturor acestor markeri și caracteristici ale BP. Primul studiu corespunde celui de-al doilea obiectiv principal și celui de-al doilea obiectiv secundar, răspunzând întrebărilor de cercetare 6 și 5 și testând ipoteza 6 și parțial primele 4 ipoteze.

Al doilea studiu are un design caz-martor. Evaluează nivelurile serice ale LPS și LBP, nivelurile serice și fecale ale zonulinei și nivelurile serice și fecale ale calprotectinei la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu controli fără BP. Al doilea studiu corespunde primului obiectiv principal și primului obiectiv secundar, răspunzând primelor 4 întrebări de cercetare și testând primele 5 ipoteze. Criteriile de includere și de excludere pentru cele 2 grupuri, cu BP sporadică probabil multifactorială și fără BP, sunt detaliate mai jos.

Al treilea studiu are tot un design caz-martor, evaluând nivelurile serice ale LPS și LBP, nivelurile serice și fecale ale zonulinei și nivelurile serice și fecale ale calprotectinei la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu pacienți cu BP familială cu debut precoce. Criteriile de includere și de excludere pentru grupul de BP sporadică sunt aceleași ca pentru al doilea studiu. Criteriile de includere și de excludere pentru grupul cu BP familială cu debut precoce sunt detaliate mai jos. Al treilea studiu corespunde primului obiectiv principal, răspunzând primelor 3 întrebări de cercetare și testând parte din primele 4 ipoteze.

Organizarea studiilor, recrutarea, înrolarea și evaluarea participanților

Studiile au fost realizate de Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, România, în colaborare cu Secțiile de Neurologie ale Spitalului Clinic Colentina și Institutul Național de Patologie „Victor Babeș”. Înrolarea în studii s-a bazat pe criterii de includere și excludere predefinite. Am evaluat participanții clinic și am colectat date din fișele medicale disponibile. De asemenea, am colectat probe de ser și fecale și am măsurat nivelurile de LPS, LBP, zonulină și calprotectină, folosind kituri ELISA disponibile comercial.

Criterii de includere pentru primul studiu: pacienți care îndeplinesc Criteriile de Diagnostic Clinic MDS pentru BP certă clinic sau clinic probabilă (Postuma et al., 2015), cu debutul simptomelor motorii după vârsta de 50 de ani, fără antecedente familiale de BP (rude de gradul I sau II) și fără alte dovezi care să sugereze BP monogenică, care au fost testați în

decurs de o lună de la înscrierea la studiu, ca parte a îngrijirii lor medicale de rutină, pentru cel puțin unul dintre markerii de inflamație periferică evaluați în cadrul studiului.

Criterii de includere pentru grupul de cazuri în al doilea și al treilea studiu (BP sporadică probabil multifactorială): pacienți care îndeplinesc Criteriile de Diagnostic Clinic MDS pentru BP certă clinic sau clinic probabilă (Postuma et al., 2015), cu debut simptomelor motorii după vârsta de 50 de ani, fără antecedente familiale de BP la rudele de gradul I sau II și fără alte dovezi care să sugereze PD monogenică (e.g., rezultatele testelor genetice, dacă sunt disponibile).

Criterii de includere pentru grupul martor în cel de-al doilea studiu (fără BP): adulți care nu îndeplinesc criteriile de diagnostic pentru BP, fără markeri clinici motori sau nonmotori pentru BP prodromală (Berg et al., 2015; Heinzl et al., 2019), cu excepția constipației izolate (nu este obligatorie, dar permisă).

Criterii de includere pentru grupul martor în cel de-al treilea studiu (BP familială cu debut precoce): pacienți care îndeplinesc Criteriile de Diagnostic Clinic MDS pentru BP certă clinic sau probabilă clinic (Postuma et al., 2015), cu debutul simptomelor motorii înainte de vârsta de 50 de ani și antecedente de BP la rudele de gradul I sau II, cu sau fără alte dovezi care sugerează BP monogenică (e.g., rezultatele testelor genetice, dacă sunt disponibile).

Criterii de excludere pentru toate studiile și grupurile: diagnostic recent (mai puțin de 6 luni) sau concomitent/în desfășurare de boli gastrointestinale sau sistemice (fără legătură cu BP) care ar putea interfera cu rezultatele testelor de laborator; accident vascular cerebral recent sau alte boli neurologice recente sau în curs de desfășurare sau dizabilitate severă care ar putea interfera cu procedurile de evaluare sau rezultatele testelor făcute în cadrul studiului; tratament cu antibiotice în ultimele 3 luni înainte de includere; utilizarea în ultima lună a altor medicamente sau suplimente care pot interfera cu rezultatele testelor de laborator.

Colectarea, stocarea și procesarea probelor biologice

Probele de sânge venos periferic au fost recoltate à jeun în ziua de după înrolarea în studiu sau în ziua înrolării în studiu. Probele de scaun au fost colectate direct de participanții la studiu, fiind ținute la temperatura camerei pentru un timp cât mai scurt, ulterior fiind refrigerate la 4-8 °C pentru maxim 24 de ore, ulterior preprocesate folosind tuburi de preparare și extracție disponibile comercial (K 6998SAS, K 6999, Immundiagnostik AG, Germany).

Metode de laborator

Markerii de expunere la endotoxină bacteriană, markerii de permeabilitate a barierei intestinale și markerii de inflamație gastrointestinală au fost mășurați în cadrul Institutului Național de Patologie „Victor Babeș” din București, folosind kituri ELISA disponibile comercial. Testarea a fost făcută conform protocolului care a venit cu fiecare kit. Au fost folosite următoarele kituri: Human Lipopolysaccharides ELISA kit CSB-E09945h (Cusabio, China), Human Lipopolysaccharides Binding Protein ELISA kit CSB-E09629h (Cusabio, China), IDK® Zonulin ELISA K 5601 (Immundiagnostik AG, Germany), IDK® Zonulin ELISA K 5600 (Immundiagnostik AG, Germany), IDK® Calprotectin ELISA K 6935 (Immundiagnostik AG, Germany), the IDK® Calprotectin ELISA K 6927 (Immundiagnostik AG, Germany).

Analiza statistică

Pentru analiza statistică am folosit IBM® SPSS® Statistics versiunea 29. Pentru calcularea puterii am folosit G*Power versiunea 3.1.9.7 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) (Faul et al., 2007).

Etică și protecția datelor personale

Cercetarea realizată este în conformitate cu Declarația de la Helsinki, protocolul fiind aprobat de Comisia de Etică a Spitalului Colentina (EMI-BPs, 3/16.04.2019, cu reaprobare în 2021). Toți participanții au semnat formularul de consimțământ informat înainte de înrolarea în studiu. Procesarea datelor personale a fost realizată în acord cu Regulamentul General de Protecție a Datelor (RGPD) 2016/679 și cu regulamentele locale în vigoare. Datele colectate au fost pseudonimizate și anonimizate înainte de a fi prelucrate statistic.

Finanțare

Evaluarea markerilor de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală a fost finanțată de Ministerul Cercetării și Inovării din România (în prezent Ministerul Cercetării, Inovării și Digitalizării) prin intermediul PN 19.29.02.01/2019, ca parte a fazelor 2 și 3 ale proiectului “Efectul produșilor microbiotei intestinale și proteinelor amiloid funcționale asupra agregării patologice a proteinelor și asupra propagării patologiei după un model prionic în modelele de neurodegenerare”, desfășurat la Institutul Național de Patologie „Victor Babeș”, București, România, sub conducerea Prof. Dr. Bogdan O. Popescu, care este totodată și conducătorul de doctorat. Finanțarea a fost obținută prin competiție.

4. Primul studiu: Corelații între markerii de inflamație periferică testați de rutină în practica clinică și markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală la pacienții cu boală Parkinson sporadică

În primul studiu am evaluat corelațiile dintre markerii periferici de inflamație testați de rutină în practica clinică și nivelurile serice de LPS și LBP, nivelurile serice și fecale de zonulină și nivelurile serice și fecale de calprotectină la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială. În studiu au fost incluși 28 de pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială (19 sex masculin, 9 sex feminin). Vârsta medie a fost 66.46 de ani.

Am obținut rezultate semnificative statistic pentru corelațiile dintre beta2-microglobulina și calprotectina serică ($r_s = 0.534$, $N = 22$, $p = 0.01$) și dintre MLR și calprotectina serică ($r_s = 0.499$, $N = 27$, $p = 0.008$). De notat că beta2-microglobulina serică a avut valori peste limita superioară a intervalului de referință la 39.13% dintre pacienți.

Nivelurile de LPS seric s-au corelat cu nivelurile de LBP ($r_s = 0.878$, $N = 27$, $p < 0.0005$). Nivelurile de zonulină fecală s-au corelat indirect cu calprotectina fecală ($r_s = -0.526$, $N = 23$, $p = 0.01$), în timp ce calprotectina serică s-a corelat cu vârsta ($r_s = 0.441$, $N = 27$, $p = 0.021$) și cu vârsta la debutul manifestărilor motorii ($r_s = 0.398$, $N = 27$, $p = 0.040$). Merită menționat că am obținut o corelație inversă semnificativă între nivelul seric de LPS și nivelul seric de acid uric ($r_s = -0.405$, $N = 26$, $p = 0.040$), un antioxidant potent.

5. Al doilea studiu: Markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală la pacienții cu boală Parkinson sporadică comparativ cu martori fără boală Parkinson

În cel de-al doilea studiu am evaluat nivelurile serice ale LPS și LBP, nivelurile serice și fecale ale zonulinei și nivelurile serice și fecale ale calprotectinei la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori fără BP. În studiu au fost incluși 56 de participanți, 28 de pacienți cu BP sporadică (19 de sex masculin, 9 de sex feminin) și 28 de martori neîmperecheați (15 de sex masculin, 13 de sex feminin). Grupul pacienților cu BP sporadică se suprapune complet peste populația primului studiu.

Nivelurile medii ale LBP au fost semnificativ mai scăzute la pacienții cu BP sporadică comparativ cu martorii (6.82 mcg/ml versus 17.28 mcg/ml, $p = 0.001$), în pofida unor niveluri similare de LPS (406.17 pg/ml versus 407.63 pg/ml, $p = 0.975$). Nivelurile serice ale LBP sub

15 mcg/ml s-au asociat cu un risc de 15 ori mai mare de a avea BP (OR 15, 95% CI: 2.972 – 75.695, $p < 0.001$), cu o sensibilitate de 92.86% și o specificitate de 53.57%.

Nivelurile medii de zonulină serică și fecală au fost semnificativ mai crescute la pacienți cu BP sporadică comparativ cu martorii fără BP (26.6 ng/ml versus 21.5 ng/ml, $p = 0.018$, respectiv 94.72 ng/ml versus 38.6 ng/ml, $p < 0.001$). Niciunul dintre participanți nu a avut niveluri ale zonulinei serice peste limita superioară a intervalului de referință, dar 18.51% dintre pacienți cu BP sporadică și 54.17% dintre martori au avut niveluri sub limita inferioară a intervalului de referință. Dintre pacienți cu BP sporadică 33.33% au avut niveluri ale zonulinei fecale deasupra limitei superioare a referinței (comparativ cu niciunul dintre martori). Valorile zonulinei serice peste 20 mg/ml s-au asociat cu un risc de 4.4 ori mai mare de a avea BP sporadică (OR 4.4, 95% CI: 1.297 – 3.092, $p = 0.023$), cu o sensibilitate de 81.4% și o specificitate de 50%. În același timp, niveluri ale zonulinei fecale peste 50 ng/ml s-au asociat cu un risc de 8.4 ori mai mare de a avea BP sporadică (OR 8.4, 95% CI 2.119 – 33.292, $p = 0.002$), cu o sensibilitate de 75% și o specificitate de 73.68%.

Nivelurile serice și fecale ale calprotectinei au fost semnificativ mai crescute la pacienți cu BP sporadică comparativ cu martorii fără BP (13.77 mcg/ml versus 6.88 mcg/ml, $p = 0.004$, și 187.16 mcg/ml versus 57.94 mcg/ml, $p < 0.001$). Niveluri ale calprotectinei serice peste limita superioară a intervalului de referință au fost identificate la 88.89% dintre pacienții cu BP sporadică și la 55.56% dintre martori. Niveluri ale calprotectinei fecale peste limita superioară a intervalului de referință au fost identificate la 91.3% dintre pacienții cu BP sporadică și la 33.33% dintre martori. De notat că valori ale calprotectinei fecale de peste 100 mcg/ml au fost identificate la 56.5% dintre pacienții cu BP sporadică și la 11.1% dintre martori, în timp ce niveluri foarte înalte ale calprotectinei fecale, peste 250 mcg/ml, au fost identificate la 26.1% dintre pacienții cu BP sporadică și la niciunul dintre martori. Niveluri ale calprotectinei serice de peste 2.5 mcg/ml s-au asociat cu un risc de 10 ori mai mare de a avea BP (OR 10, 95%CI: 1.963 – 50.940, $p = 0.004$), cu o sensibilitate de 92.6% și o specificitate de 44.44%, în timp ce nivelurile calprotectinei fecale peste 100 mcg/ml s-au asociat cu un risc de 10.4 ori mai mare de a avea BP sporadică (OR 10.4, 95% CI: 1.928 – 56.102, $p = 0.004$), cu o sensibilitate de 56.52% și o specificitate de 88.89%.

Studiul a inclus multiple modele de regresie logistică binară, toate arătând că nivelurile serice crescute ale LBP se asociază cu o probabilitate semnificativ mai mică de a avea BP sporadică, în timp ce nivelurile mai crescute ale zonulinei și calprotectinei fecale se asociază cu o probabilitate semnificativ mai mare de a avea BP sporadică.

Cinci studii, inclusiv studiul prezent, au evaluat nivelurile serice ale LPS la pacienți cu BP sporadică / idiopatică, trei dintre acestea găsind niveluri mai crescute la pacienți cu BP (de Waal et al., 2018; Loffredo et al., 2020; Wijeyekoon et al., 2020), în timp ce un alt studiu foarte mic (Forsyth et al., 2011), ca și studiul acesta, nu au găsit nicio diferență.

Șase studii transversale caz-martor, inclusiv studiul actual, au evaluat nivelurile LBP la pacienți cu BP sporadică / idiopatică comparativ cu martori fără BP. Toate au găsit valori semnificativ mai scăzute la pacienții cu BP (Chen et al., 2021; Forsyth et al., 2011; Hasegawa et al., 2015; Pal et al., 2015; Perez-Pardo et al., 2019). Dimpotrivă, un studiu caz-control realizat pe o cohortă europeană mare prospectivă a arătat că valori pre-diagnostice mai crescute ale nivelului plasmatic de LBP s-ar putea asocia cu un risc mai mare de a dezvolta BP (Zhao et al., 2023). Aceste rezultate aparent contradictorii susțin rolul endotoxinemiei în patogeniza BP sporadice și fac necesară investigarea suplimentară. Existența valorilor scăzute ale LBP la pacienții cu BP nu este complet înțeleasă, expunerea cronică la cantități mari de LPS scăzând posibil producția de LBP (Chen et al., 2021; Ding and Jin, 2014; Gutschmann et al., 2001; Martin et al., 1992; Meng et al., 2021). În același timp vârsta înaintată, excesul ponderal, sindromul metabolic și tabagismul se asociază cu niveluri crescute de LBP (Gonzalez-Quintela et al., 2013), fiind potențiali factori de confuzie.

Pacienții cu BP au permeabilitate crescută a barierei intestinale (Forsyth et al., 2011). Trei studii, inclusiv studiul prezent (rezultate parțial publicate), au evaluat nivelurile serice ale zonulinei la pacienți cu BP sporadică / idiopatică, găsindu-le crescute comparativ cu martorii fără BP, ceea ce sugerează permeabilitate crescută a barierei intestinale (Boncuk Ulas et al., 2023; Dumitrescu et al., 2021; Loffredo et al., 2020). Nivelurile zonulinei fecale la pacienți cu BP sporadică / idiopatică au fost evaluate în patru studii, inclusiv studiul actual (rezultate parțial publicate), toate acestea găsind valori crescute la pacienți cu BP (Aho et al., 2021; Dumitrescu et al., 2021; Mulak et al., 2019; Schwiertz et al., 2018).

Niciun alt studiu cu excepția studiului de față nu a evaluat nivelurile serice ale calprotectinei la pacienții cu BP. Șapte studii, inclusiv studiul actual (rezultate parțial publicate) au evaluat nivelurile calprotectinei fecale la pacienți cu BP sporadică/idiopatică, toate găsind valori semnificativ mai mari la pacienți comparativ cu martorii fără BP (Aho et al., 2021; Augustin et al., 2023; Dumitrescu et al., 2021; Hor et al., 2022; Mulak et al., 2019; Schwiertz et al., 2018; Weis et al., 2019).

6. Al treilea studiu: Markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală la pacienții cu boală Parkinson sporadică comparativ cu martori cu boală Parkinson familială cu debut precoce

În cel de-al treilea studiu am evaluat nivelurile serice ale LPS și LBP, nivelurile serice și fecale ale zonulinei și nivelurile serice și fecale ale calprotectinei la pacienții cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori cu BP familială cu debut precoce. Studiul a inclus 33 de participanți, 28 de pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială și 5 martori cu BP familială cu debut precoce. Grupul pacienților cu BP sporadică se suprapune complet pe grupul pacienților cu BP din primele două studii.

Nivelurile serice medii ale LPS au fost mai înalte la pacienții cu BP sporadică comparativ cu pacienții cu BP familială (406.17 mcg/ml versus 209.41 pg/ml), deși fuseseră similare în grupul pacienților cu BP sporadică comparativ cu martorii fără BP (vezi al doilea studiu). Nivelurile medii ale LBP serice au fost mai scăzute în grupul pacienților cu BP sporadică decât în grupul pacienților cu BP familială (6.82 mcg/ml versus 12.50 mcg/ml). Nivelurile medii ale zonulinei au fost similare la pacienții cu BP sporadică și familială, dar mai înalte decât la martorii fără BP (26.6 ng/ml versus 27.78 ng/ml versus 1.5 ng/ml). Nivelurile medii ale zonulinei fecale au fost mai înalte la pacienții cu BP sporadică comparativ cu cei cu BP familială (94.72 ng/ml versus 25.86 ng/ml). Nivelurile medii ale calprotectinei serice au fost mai înalte la pacienții cu BP sporadică decât la pacienții cu BP familială, fiind mai crescute însă comparativ cu martorii fără BP (13.77 mcg/ml versus 10.38 mcg/ml versus 6.88 mcg/ml). Nivelurile medii ale calprotectinei fecale au fost mai înalte la pacienții cu BP sporadică decât la cei cu BP familială, dar mai înalte și la pacienții cu BP familială comparativ cu martorii fără BP (187.16 mcg versus 145.92 mcg/ml versus 57.94 mcg/ml).

În acest studiu am identificat valori mai crescute ale LPS seric și ale zonulinei fecale și valori mai scăzute ale LBP la pacienții cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu pacienții cu BP familială cu debut precoce (probabil monogenică). Rezultatele acestui studiu sugerează că valorile LPS sunt scăzute la pacienții cu BP probabil monogenică, făcând puțin probabil un rol important al endotoxinemiei la aceștia – deși, este plauzibil ca în prezența variantelor genice patogene să fie necesare cantități mai mici de LPS. Merită notată tendința unor valori mai crescute ale markerilor de inflamație intestinală la pacienții cu BP probabil monogenică, aspect care necesită investigare suplimentară.

7. Concluzii și contribuții personale

Cercetarea mea doctorală include trei studii care își propun să contribuie la o mai bună caracterizare a relațiilor dintre expunerea la endotoxină bacteriană (LPS fiind, între altele, un produs amiloidogen al microbiotei intestinale), permeabilitatea barierei intestinale și inflamația gastrointestinală în BP sporadică.

Principalele rezultate pe care le-am obținut sunt în concordanță cu literatura disponibilă. În pofida limitărilor studiilor pe care le-am realizat, în principal legate de numărul mic de participanți, designul transversal și specificitatea markerilor de laborator utilizați, cercetarea mea doctorală aduce dovezi suplimentare cu privire la existența expunerii cronice la endotoxină, a disfuncția barierei intestinale și a inflamației gastrointestinale la pacienții cu BP sporadică multifactorială și la potențialul rol pe care acestea l-ar putea avea în apariția și progresia BP. Existența unei microbiote amiloidogene însoțită de creșterea permeabilității intestinale și de inflamație gastrointestinală ar putea crea un mediu care să favorizeze dezvoltarea BP multifactoriale cu debut enteral la persoane susceptibile.

Studii viitoare, pe cohorte prospective mai mari, sunt necesare pentru a confirma și pentru a dezvolta rezultatele actuale, precum și pentru a găsi cele mai bune modalități de a transpune aceste rezultate în practica clinică. Aceste studii viitoare ar trebui să fie axate pe evaluarea multimodală a microbiomului intestinal, a barierei intestinale și a inflamației gastrointestinale.

7.2. Sumarul contribuțiilor personale

Cercetarea mea doctorală contribuie la o mai bună înțelegere a relațiilor dintre expunerea la endotoxină bacteriană, permeabilitatea barierei intestinale și inflamație gastrointestinală în BP sporadică, după cum urmează:

1. Primul studiu (Capitolul 4) oferă rezultatele primului și singurului studiu disponibil până la acest moment asupra corelațiilor dintre markerii de inflamație periferică testați de rutină în practica clinică și markerii de laborator de expunere la endotoxină bacteriană (i.e., LPS și LBP în ser), markerii de permeabilitate a barierei intestinale (i.e., zonulina serică și fecală) și markerii de inflamație gastrointestinală (i.e., calprotectina serică și fecală). În acest studiu am găsit că beta2-microglobulina serică și MLR se corelează direct cu calprotectina serică. Aceste corelații nu au fost raportate până în prezent dar sunt plauzibile biologic.

2. Al doilea studiu (Capitolul 5) oferă rezultatele primului și singurului studiu disponibil până la momentul actual care evaluează markerii de laborator de expunere la endotoxină, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori fără BP. În acest studiu am găsit că

nivelul seric al LBP este semnificativ mai scăzut la pacienții cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martorii fără BP, în pofida unor niveluri similare ale LPS seric. Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele disponibile în literatură, nivelurile scăzute ale LPS reflectând fie expunere cronică la LPS fie un răspuns alterat la LPS. Totodată, am găsit că nivelurile serice și fecale de zonulină și calprotectină sunt semnificativ mai mari la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martorii fără BP, indicând coexistența disfuncției barierei intestinale și a inflamației gastrointestinale. Modelele de regresie logistică pe care le-am realizat au arătată că nivelurile mai crescute ale LBP seric se asociază cu o probabilitate semnificativ mai mică de a avea BP sporadică, în timp ce nivelurile fecale crescute ale zonulinei și calprotectinei se asociază cu o probabilitate semnificativ mai mare de a avea BP sporadică probabil multifactorială.

3. Al treilea studiu (Capitolul 6) oferă rezultatele primului și singurului studiu disponibil până la momentul actual care evaluează markerii de expunere la endotoxină bacteriană, de permeabilitate a barierei intestinale și de inflamație gastrointestinală la pacienți cu BP sporadică probabil multifactorială comparativ cu martori cu BP familială cu debut precoce (i.e., probabil monogenică). Numărul de participanți în grupul martor a fost foarte mic, însă rezultatele studiului sugerează că este pertinentă investigarea suplimentară a nivelurilor serice și fecale ale calprotectinei și a markerilor de expunere la endotoxină bacteriană la pacienții cu BP monogenică comparativ cu martori cu BP sporadică multifactorială și martori fără BP.

Bibliografie selectivă

Aho, V.T.E., Houser, M.C., Pereira, P.A.B., Chang, J., Rudi, K., Paulin, L., *et al.* (2021). Relationships of gut microbiota, short-chain fatty acids, inflammation, and the gut barrier in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 16, 6.

Ajamian, M., Steer, D., Rosella, G., and Gibson, P.R. (2019). Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems. *PLoS One* 14, e0210728.

Ascherio, A., and Schwarzschild, M.A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol* 15, 1257-1272.

Augustin, A., Guennec, A.L., Umamahesan, C., Kendler-Rhodes, A., Tucker, R.M., Chekmeneva, E., *et al.* (2023). Faecal metabolite deficit, gut inflammation and diet in Parkinson's disease: Integrative analysis indicates inflammatory response syndrome. *Clin Transl Med* 13, e1152.

Balestrino, R., and Schapira, A.H.V. (2020). Parkinson disease. *European journal of neurology* 27, 27-42.

Baldini, F., Hertel, J., Sandt, E., Thinnies, C.C., Neuberger-Castillo, L., Pavelka, L., *et al.* (2020). Parkinson's disease-associated alterations of the gut microbiome predict disease-relevant changes in metabolic functions. *BMC Biol* 18, 62.

Bedarf, J.R., Hildebrand, F., Coelho, L.P., Sunagawa, S., Bahram, M., Goeser, F., *et al.* (2017). Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients. *Genome Med* 9, 39.

Berg, D., Postuma, R.B., Bloem, B., Chan, P., Dubois, B., Gasser, T., *et al.* (2014). Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. *Mov Disord* 29, 454-462.

Berg, D., Postuma, R.B., Adler, C.H., Bloem, B.R., Chan, P., Dubois, B., *et al.* (2015). MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord* 30, 1600-1611.

Bhattacharyya, D., and Bhunia, A. (2021). Gut-Brain axis in Parkinson's disease etiology: The role of lipopolysaccharide. *Chem Phys Lipids* 235, 105029.

Boncuk Ulas, S., Guzey Aras, Y., Irmak Gozukara, S., Acar, T., and Acar, B.A. (2023). Correlates of Zonulin and Claudin-5, markers of intestinal and brain endothelial permeability, in Parkinson's Disease: A pilot study. *Parkinsonism Relat Disord* 110, 105361.

Borghammer, P. (2021). The alpha-Synuclein Origin and Connectome Model (SOC Model) of Parkinson's Disease: Explaining Motor Asymmetry, Non-Motor Phenotypes, and Cognitive Decline. *J Parkinsons Dis* 11, 455-474.

Borghammer, P., and Van Den Berge, N. (2019). Brain-First versus Gut-First Parkinson's Disease: A Hypothesis. *J Parkinsons Dis* 9, S281-S295.

Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., and Braak, E. (2003a). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24, 197-211.

Braak, H., and Del Tredici, K. (2017). Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. *J Parkinsons Dis* 7, S71-S85.

Braak, H., de Vos, R.A., Bohl, J., and Del Tredici, K. (2006). Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 396, 67-72.

Brown, G.C. (2019). The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 16, 180.

Brown, G.C., Camacho, M., and Williams-Gray, C.H. (2023). The Endotoxin Hypothesis of Parkinson's Disease. *Mov Disord* 38, 1143-1155.

Chen, C.K., Huang, J.Y., Wu, Y.T., and Chang, Y.C. (2018). Dental Scaling Decreases the Risk of Parkinson's Disease: A Nationwide Population-Based Nested Case-Control Study. *Int J Environ Res Public Health* 15.

Chen, C.K., Wu, Y.T., and Chang, Y.C. (2017). Periodontal inflammatory disease is associated with the risk of Parkinson's disease: a population-based retrospective matched-cohort study. *PeerJ* 5, e3647.

Chen, S.J., Chi, Y.C., Ho, C.H., Yang, W.S., and Lin, C.H. (2021). Plasma Lipopolysaccharide-Binding Protein Reflects Risk and Progression of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 11, 1129-1139.

Cirstea, M.S., Yu, A.C., Golz, E., Sundvick, K., Kligler, D., Radisavljevic, N., *et al.* (2020). Microbiota Composition and Metabolism Are Associated With Gut Function in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 35, 1208-1217.

Citronberg, J.S., Wilkens, L.R., Lim, U., Hullar, M.A., White, E., Newcomb, P.A., *et al.* (2016). Reliability of plasma lipopolysaccharide-binding protein (LBP) from repeated measures in healthy adults. *Cancer Causes Control* 27, 1163-1166.

Clunn, G., Hughes, A., and Schachter, M. (2000). Endotoxin-lipoprotein hypothesis. *Lancet* 356, 2097-2098

Coughlin, D.G., Petrovitch, H., White, L.R., Noorigian, J., Masaki, K.H., Ross, G.W., *et al.* (2019). Most cases with Lewy pathology in a population-based cohort adhere to the Braak progression pattern but 'failure to fit' is highly dependent on staging system applied. *Parkinsonism Relat Disord* 64, 124-131.

de Waal, G.M., Engelbrecht, L., Davis, T., de Villiers, W.J.S., Kell, D.B., and Pretorius, E. (2018). Correlative Light-Electron Microscopy detects lipopolysaccharide and its association with fibrin fibres in Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Sci Rep* 8, 16798.

Deng, I., Corrigan, F., Zhai, G., Zhou, X.F., and Bobrovskaya, L. (2020). Lipopolysaccharide animal models of Parkinson's disease: Recent progress and relevance to clinical disease. *Brain Behav Immun Health* 4, 100060.

Devos, D., Lebouvier, T., Lardeux, B., Biraud, M., Rouaud, T., Pouclet, H., *et al.* (2013). Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 50, 42-48.

Dhaliwal, A., Zeino, Z., Tomkins, C., Cheung, M., Nwokolo, C., Smith, S., *et al.* (2015). Utility of faecal calprotectin in inflammatory bowel disease (IBD): what cut-offs should we apply? *Frontline Gastroenterol* 6, 14-19.

Diamanti, A., Panetta, F., Basso, M.S., Forgione, A., Colistro, F., Bracci, F., *et al.* (2010). Diagnostic work-up of inflammatory bowel disease in children: the role of calprotectin assay. *Inflamm Bowel Dis* 16, 1926-1930.

Ding, P.H., and Jin, L.J. (2014). The role of lipopolysaccharide-binding protein in innate immunity: a revisit and its relevance to oral/periodontal health. *J Periodontal Res* 49, 1-9.

Dumitrescu, L., Marta, D., Danau, A., Lefter, A., Tulba, D., Cozma, L., *et al.* (2021). Serum and Fecal Markers of Intestinal Inflammation and Intestinal Barrier Permeability Are Elevated in Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 15, 689723.

Dumitrescu, L., Popescu-Olaru, I., Cozma, L., Tulba, D., Hinescu, M.E., Ceafalan, L.C., *et al.* (2018). Oxidative Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Oxid Med Cell Longev* 2018, 2406594.

Dutta, G., Zhang, P., and Liu, B. (2008). The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol* 22, 453-464.

Erridge, C., Attina, T., Spickett, C.M., and Webb, D.J. (2007). A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr* 86, 1286-1292.

Fasano, A. (2012). Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1258, 25-33.

Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.G., and Buchner, A. (2007). G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39, 175-191.

Forsyth, C.B., Shannon, K.M., Kordower, J.H., Voigt, R.M., Shaikh, M., Jaglin, J.A., *et al.* (2011). Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. *PLoS One* 6, e28032.

Gao, H.M., Zhang, F., Zhou, H., Kam, W., Wilson, B., and Hong, J.S. (2011a). Neuroinflammation and alpha-synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 119, 807-814.

Gonzalez-Quintela, A., Alonso, M., Campos, J., Vizcaino, L., Loidi, L., and Gude, F. (2013). Determinants of serum concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the adult population: the role of obesity. *PLoS One* 8, e54600.

Gorecki, A.M., Preskey, L., Bakeberg, M.C., Kenna, J.E., Gildenhuis, C., MacDougall, G., *et al.* (2019). Altered Gut Microbiome in Parkinson's Disease and the Influence of Lipopolysaccharide in a Human alpha-Synuclein Over-Expressing Mouse Model. *Front Neurosci* 13, 839.

Grand, A., Rochette, E., Dutheil, F., Gozal, D., Calcaterra, V., Berni Canani, R., *et al.* (2020). Body Mass Index and Calprotectin Blood Level Correlation in Healthy Children: An Individual Patient Data Meta-Analysis. *J Clin Med* 9.

Gutsmann, T., Muller, M., Carroll, S.F., MacKenzie, R.C., Wiese, A., and Seydel, U. (2001). Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun* 69, 6942-6950.

Hasegawa, S., Goto, S., Tsuji, H., Okuno, T., Asahara, T., Nomoto, K., *et al.* (2015). Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease. *PLoS One* 10, e0142164.

Hawkes, C.H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2007). Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 599-614.

Hawkes, C.H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2009). Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann N Y Acad Sci* 1170, 615-622.

Heintz-Buschart, A., Pandey, U., Wicke, T., Sixel-Doring, F., Janzen, A., Sittig-Wiegand, E., *et al.* (2018). The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder. *Mov Disord* 33, 88-98.

Heinzel, S., Berg, D., Gasser, T., Chen, H., Yao, C., Postuma, R.B., *et al.* (2019). Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov Disord* 34, 1464-1470.

Hersoug, L.G., Moller, P., and Loft, S. (2016). Gut microbiota-derived lipopolysaccharide uptake and trafficking to adipose tissue: implications for inflammation and obesity. *Obes Rev* 17, 297-312.

Hill-Burns, E.M., Debelius, J.W., Morton, J.T., Wissemann, W.T., Lewis, M.R., Wallen, Z.D., *et al.* (2017). Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Mov Disord* 32, 739-749.

Hor, J.W., Lim, S.Y., Khor, E.S., Chong, K.K., Song, S.L., Ibrahim, N.M., *et al.* (2022). Fecal Calprotectin in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *J Mov Disord* 15, 106-114.

Horsager, J., Andersen, K.B., Knudsen, K., Skjaerbaek, C., Fedorova, T.D., Okkels, N., *et al.* (2020). Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study. *Brain* 143, 3077-3088.

Horsager, J., Knudsen, K., and Sommerauer, M. (2022). Clinical and imaging evidence of brain-first and body-first Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 164, 105626.

Houser, M.C., Chang, J., Factor, S.A., Molho, E.S., Zabetian, C.P., Hill-Burns, E.M., *et al.* (2018). Stool Immune Profiles Evince Gastrointestinal Inflammation in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 33, 793-804.

Houser, M.C., and Tansey, M.G. (2017). The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *NPJ Parkinsons Dis* 3, 3.

Jensen, M.D., Kjeldsen, J., and Nathan, T. (2011). Fecal calprotectin is equally sensitive in Crohn's disease affecting the small bowel and colon. *Scand J Gastroenterol* 46, 694-700.

Kelly, L.P., Carvey, P.M., Keshavarzian, A., Shannon, K.M., Shaikh, M., Bakay, R.A., *et al.* (2014). Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson's disease. *Mov Disord* 29, 999-1009.

Khaki-Khatibi, F., Qujeq, D., Kashifard, M., Moein, S., Maniati, M., and Vaghari-Tabari, M. (2020). Calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* 510, 556-565.

Kitabatake, H., Tanaka, N., Fujimori, N., Komatsu, M., Okubo, A., Kakegawa, K., *et al.* (2017). Association between endotoxemia and histological features of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 23, 712-722.

Kowalski, K., and Mulak, A. (2019). Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *J Neurogastroenterol Motil* 25, 48-60.

Lang, A.E., Siderowf, A.D., Macklin, E.A., Poewe, W., Brooks, D.J., Fernandez, H.H., *et al.* (2022). Trial of Cinpanemab in Early Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 387, 408-420.

Lange, J.H., Niehaus, I., and Thomulka, K.W. (2003). Is endotoxin an environmental cause of Parkinson's disease? *Neuroepidemiology* 22, 313; author reply 314.

Lerner, A. (2022). The intestinal luminal sources of alpha-synuclein: a gastroenterologist perspective. *Nutr Rev* 80, 282-293.

Loffredo, L., Ettorre, E., Zicari, A.M., Inghilleri, M., Nocella, C., Perri, L., *et al.* (2020). Oxidative Stress and Gut-Derived Lipopolysaccharides in Neurodegenerative Disease: Role of NOX2. *Oxid Med Cell Longev* 2020, 8630275.

Manole, E.[#], **Dumitrescu, L.**[#], Niculițe, C., Popescu, B.-O., and Ceafalan, L.-C. (2021). Potential roles of functional bacterial amyloid proteins, bacterial biosurfactants and other putative gut microbiota products in the etiopathogeny of Parkinson's Disease. *BIOCELL* 45, 1--16.

Martin, T.R., Mathison, J.C., Tobias, P.S., Leturcq, D.J., Moriarty, A.M., Maunder, R.J., *et al.* (1992). Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *J Clin Invest* 90, 2209-2219.

Massier, L., Chakaroun, R., Kovacs, P., and Heiker, J.T. (2021). Blurring the picture in leaky gut research: how shortcomings of zonulin as a biomarker mislead the field of intestinal permeability. *Gut* 70, 1801-1802.

Meng, L., Song, Z., Liu, A., Dahmen, U., Yang, X., and Fang, H. (2021). Effects of Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in Infections, Inflammatory Diseases, Metabolic Disorders and Cancers. *Front Immunol* 12, 681810.

Mezey, E., Dehejia, A.M., Harta, G., Tresser, N., Suchy, S.F., Nussbaum, R.L., *et al.* (1998). Alpha synuclein is present in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Mol Psychiatry* 3, 493-499.

Moein, S., Qujeq, D., Vaghari Tabari, M., Kashifard, M., and Hajian-Tilaki, K. (2017). Diagnostic accuracy of fecal calprotectin in assessing the severity of inflammatory bowel disease: From laboratory to clinic. *Caspian J Intern Med* 8, 178-182.

Morkl, S., Lackner, S., Meinitzer, A., Mangge, H., Lehofer, M., Halwachs, B., *et al.* (2018). Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women. *Eur J Nutr* 57, 2985-2997.

Mortensen, O.H., Nielsen, A.R., Erikstrup, C., Plomgaard, P., Fischer, C.P., Krogh-Madsen, R., *et al.* (2009). Calprotectin--a novel marker of obesity. *PLoS One* 4, e7419.

Mulak, A., Koszewicz, M., Panek-Jeziorna, M., Kozirowska-Gawron, E., and Budrewicz, S. (2019). Fecal Calprotectin as a Marker of the Gut Immune System Activation Is Elevated in Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 13, 992.

Niehaus, I., and Lange, J.H. (2003). Endotoxin: is it an environmental factor in the cause of Parkinson's disease? *Occup Environ Med* 60, 378.

Nishiwaki, H., Ito, M., Ishida, T., Hamaguchi, T., Maeda, T., Kashiwara, K., *et al.* (2020). Meta-Analysis of Gut Dysbiosis in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 35, 1626-1635.

Nuzum, N.D., Loughman, A., Szymlek-Gay, E.A., Hendy, A., Teo, W.P., and Macpherson, H. (2020). Gut microbiota differences between healthy older adults and

individuals with Parkinson's disease: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 112, 227-241.

Ohlsson, B., Orho-Melander, M., and Nilsson, P.M. (2017a). Higher Levels of Serum Zonulin May Rather Be Associated with Increased Risk of Obesity and Hyperlipidemia, Than with Gastrointestinal Symptoms or Disease Manifestations. *Int J Mol Sci* 18.

Ohlsson, B., Roth, B., Larsson, E., and Hoglund, P. (2017b). Calprotectin in serum and zonulin in serum and feces are elevated after introduction of a diet with lower carbohydrate content and higher fiber, fat and protein contents. *Biomed Rep* 6, 411-422.

Olsen, I., Kell, D.B., and Pretorius, E. (2020). Is *Porphyromonas gingivalis* involved in Parkinson's disease? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 39, 2013-2018.

Pagano, G., Taylor, K.I., Anzures-Cabrera, J., Marchesi, M., Simuni, T., Marek, K., *et al.* (2022). Trial of Prasinezumab in Early-Stage Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 387, 421-432.

Pal, G.D., Shaikh, M., Forsyth, C.B., Ouyang, B., Keshavarzian, A., and Shannon, K.M. (2015). Abnormal lipopolysaccharide binding protein as marker of gastrointestinal inflammation in Parkinson disease. *Front Neurosci* 9, 306.

Perez-Pardo, P., Dodiya, H.B., Engen, P.A., Forsyth, C.B., Huschens, A.M., Shaikh, M., *et al.* (2019). Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice. *Gut* 68, 829-843.

Postuma, R.B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C.W., Oertel, W., *et al.* (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 30, 1591-1601.

Raetz, C.R., and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71, 635-700.

Sampson, T.R., Debelius, J.W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G.G., Ilhan, Z.E., *et al.* (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 167, 1469-1480 e1412.

Sapone, A., de Magistris, L., Pietzak, M., Clemente, M.G., Tripathi, A., Cucca, F., *et al.* (2006). Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 55, 1443-1449.

Scheperjans, F. (2016). Gut microbiota, 1013 new pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Curr Opin Neurol* 29, 773-780.

Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P.A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., *et al.* (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 30, 350-358.

Schwartz, A., Spiegel, J., Dillmann, U., Grundmann, D., Burmann, J., Fassbender, K., *et al.* (2018). Fecal markers of intestinal inflammation and intestinal permeability are elevated in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 50, 104-107.

Schumann, R.R. (2011). Old and new findings on lipopolysaccharide-binding protein: a soluble pattern-recognition molecule. *Biochem Soc Trans* 39, 989-993.

Seethaler, B., Basrai, M., Neyrinck, A.M., Nazare, J.A., Walter, J., Delzenne, N.M., *et al.* (2021). Biomarkers for assessment of intestinal permeability in clinical practice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.

Shannon, K.M. (2022). Gut-Derived Sterile Inflammation and Parkinson's Disease. *Front Neurol* 13, 831090.

Talley, N.J., Holtmann, G.J., Jones, M., Koloski, N.A., Walker, M.M., Burns, G., *et al.* (2020). Zonulin in serum as a biomarker fails to identify the IBS, functional dyspepsia and non-coeliac wheat sensitivity. *Gut* 69, 1-3.

Vatanen, T., Kostic, A.D., d'Hennezel, E., Siljander, H., Franzosa, E.A., Yassour, M., *et al.* (2016). Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell* 165, 1551.

Walsham, N.E., and Sherwood, R.A. (2016). Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol* 9, 21-29.

Weis, S., Schwartz, A., Unger, M.M., Becker, A., Fassbender, K., Ratering, S., *et al.* (2019). Effect of Parkinson's disease and related medications on the composition of the fecal bacterial microbiota. *NPJ Parkinsons Dis* 5, 28.

WHO (2023). World Health Organisation. Parkinson disease. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>. Last update 13.06.2022. Access Date: 19.02.2023.

Wijeyekoon, R.S., Kronenberg-Versteeg, D., Scott, K.M., Hayat, S., Kuan, W.L., Evans, J.R., *et al.* (2020). Peripheral innate immune and bacterial signals relate to clinical heterogeneity in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* 87, 473-488.

Yan, Z., Yang, F., Cao, J., Ding, W., Yan, S., Shi, W., *et al.* (2021). Alterations of gut microbiota and metabolome with Parkinson's disease. *Microb Pathog* *160*, 105187.

Yao, Z., Mates, J.M., Cheplowitz, A.M., Hammer, L.P., Maiseyeu, A., Phillips, G.S., *et al.* (2016). Blood-Borne Lipopolysaccharide Is Rapidly Eliminated by Liver Sinusoidal Endothelial Cells via High-Density Lipoprotein. *J Immunol* *197*, 2390-2399.

Zhao, Y., Walker, D.I., Lill, C.M., Bloem, B.R., Darweesh, S.K.L., Pinto-Pacheco, B., *et al.* (2023). Lipopolysaccharide-binding protein and future Parkinson's disease risk: a European prospective cohort. *J Neuroinflammation* *20*, 170.